

酵素純化方法

Enzyme Purification

純化酵素前要先把儀器及用具建立好，並熟悉所有的基本操作方法，以免事倍功半；最主要的純化工具為液相色層分析法，有很多種操作方式，以便應用在各種不同的蛋白質樣本。

1 酵素純化實驗室：

實驗室的設備與經營管理，在有形或無形中，影響實驗的品質或其成敗甚鉅。

1.1 儀器：

a. 基本設備：

小型儀器可歸納成 電泳 與 層析 兩大類，大型儀器主要有 離心機 及 光度計 兩類。

- (1) 基本設備有： 純水製造系統、製冰機、高速冷凍離心機 (20,000 rpm)、微量離心機、電泳及轉印系統 (包含供電器)、ELISA 光度計，及各種層析管柱系統 (包含分劃收集器)。其中電泳與層析包含很多獨立的小型器具，使用上較複雜。
- (2) 個人電腦及周邊： 今日的實驗室已經離不開電腦，不管是套裝軟體或者網路的應用，都不可缺乏。
- (3) 進一步的設備有： 超高速離心機、冷凍乾燥機、超微膜過濾系統、雙向電泳、等電焦集電泳系統、分光光度計 (UV 及可見光)、HPLC 或 FPLC。
- (4) 特別的設備有： 液相閃爍計數器、原子吸收光譜分析儀、毛細管電泳，其他貴重儀器如：蛋白質定序儀、質譜儀、影像分析系統、分子結構電腦工作站。

b. 儀器管理及使用：

- (1) 每件儀器應指定專人管理，負責保管零附件、說明書，並做初級保養。儀器若不能正常使用，並發揮其最大服務功能，則其設置純為枉然。
- (2) 光學或精密儀器，應放在有除溼機的密閉室；發熱的器具應當集中放在通風良好處，並且注意電容量是否足夠，以免過荷造成災害。
- (3) 使用儀器前，要先熟悉操作法；有問題必請教管理人，使用前後應登記 (登入、登出)，有任何毛病要立刻反映，不可隱瞞。

c. 冰箱：

- (1) 應妥善規劃貯位，詳細表列內藏物品；藥品分類用小盒裝在一起 (貨櫃化)，勿零散堆積，以免臨時翻找費時，導致冰櫃失溫。

- (2) 零下的冷凍櫃，勿使用無霜冰箱；因為定時除霜裝置會造成冰箱內溫度上升，藥品可能會因反復『凍結-解凍』而失去活性；若不得已使用自動除霜冰箱，可裝在普利龍盒子內，使藥品傷害降至最低，也可減輕停電所造成的傷害。
- (3) 時時注意冰箱門一定要關好，尤其是零度以下的冰箱，若因門不閉緊而造成回溫，對藥品及冰箱都是大災難。

1.2 小型器具及消耗品：

a. 常用小型器具：

均質機或果汁機、磨粉機、pH 測定計、天平、水浴、冰筒、自動吸管 (20, 200, 1000 μL 三種)、磁鐵攪拌機、試管振盪器、試管架、滴管。

b. 公用器具：

應集中放在定位，用畢立刻清理歸位！自動吸管應經常校正，可吸取純水在天平秤之，每 1.0 mL 水應秤得 1.0 gm，若誤差在 3% 以上，立即送修。

c. 常用消耗品：

自動吸管頭 (黃色及藍色)、微量離心管 (microfuge tube)、大小離心管、濾紙、紗布、棉花、手套、擦拭紙、透析袋、保鮮膜、鋁箔紙及玻璃試管等。

1.3 藥品：

a. 貯存溫度：

- (1) 每種藥品有其最適當的貯存溫度，切要遵守；一般分為：室溫、4°C 及 -20°C 三種，又可依其為固体、液体或高純度者，分別置放。
- (2) 除了常用的大宗藥品 (如 NaCl)，較精密或不穩定的試劑 (如大部分酵素) 最好不要大量屯積，因為貯藏時間太久無法控制其品質。

b. 分裝凍藏藥品：

- (1) 由冰箱取出之藥品，應在充分回溫之後，才能開罐。
- (2) 使用極度頻繁的藥品，應分裝後凍藏 (aliquot)，每次取用一個分裝，可不用等待回溫，但用後也不再收回凍藏。

c. 藥品純度：

一般依純度及用途分為數級，如 和光 分為：化學用、一級、特級，Merck 藥品則分為：合成 (for synthesis)、特純 (extra pure)、生化用 (for biochemistry)、試藥 (pro analysis 或 GR)。各種等級的藥品，應當用在適當的實驗，否則不是浪費，就是因藥品純度不佳而致實驗失敗。

d. 注意添加物：

許多商品所供應的酵素，是保存在硫酸銨懸浮液中，可較為安定；但使用前要先透析，除去硫酸銨；否則在硫酸銨下分析活性，會造成誤判。也要注意酵素的來源，及其所含的鹽類，會不會影響你的實驗。

1.4 個人用品：

a. 個人藥品：

所有藥品一定要加標籤（圖 1.1），註明 日期、藥品名稱、使用人姓名 等，藥品名稱勿用暗號，以免日後連自己都忘掉是何試劑。試劑勿配製過量，因大多數的藥品在久貯後均不穩定；要檢查緩衝液內有無長霉！每個人的藥品應集中一處固定收存，切忌到處存放。

b. 立刻清洗：

玻璃用具（如試管、燒杯、三角瓶等）使用後，請儘量在當日清洗掉，這是最省時省力的。用清潔液浸泡時，不要用洗衣的肥皂粉，要使用液態的洗潔精，並應在兩日內清洗掉，因為可以說是『越泡越髒』的！

c. 做完實驗後：

一定要把所用過的 儀器、實驗桌、用具 等整理乾淨，回復原狀。離開前要從頭回顧，檢查所有使用過的儀器或實驗桌，也許會發現重要的藥品或樣本忘了收起來，或貴重的儀器忘了關機。

濃度	名稱	pH
1 M	Tris-HCl	pH 8.0
Juang	990608	

圖 1.1 藥品試劑標籤

2 蛋白質抽取：

酵素的純化過程，約可分為三個階段：

- (1) 粗蛋白質 (crude protein)：採樣 → 均質打破細胞 → 抽出全蛋白，多使用鹽析沉澱法；可以粗略去除蛋白質以外的物質。
- (2) 部分純化 (partially purified)：初步的純化，使用各種管柱層析法。
- (3) 均質酵素 (homogeneous)：目標酵素的進一步精製純化，可用製備式電泳或 HPLC。

圖 2.1 列出其相關的純化及分析方法。

2.1 如何開始？

- 先考慮以下諸點： 5W
- a. 要純化那一個蛋白質？ What ?
 - b. 為何要純化此蛋白質？ Why ?
 - c. 由何種材料純化？ Where?
 - d. 由那一個生長期？ When ?
 - e. 如何純化此蛋白質？ How ?

2.2 材料來源：

a. 材料取得：

抽取酵素的材料來源，通常不外動物、植物及微生物，或可用動植物的細胞或組織培養。採樣時，應考慮在那一個生長期、在那一個器官或組織中，有最高的酵素含量。材料的採集會大大影響實驗的成敗，遇到材料採集有困難，或者材料品質不穩定時，更是花費時間、精神。一定要控制穩定的材料來源！

b. 材料的差異性很大：

植物細胞比起動物細胞，構造上有許多差異，在材料的選擇上，應特別注意。植物的細胞壁相當堅硬，要用相當大的力量去打破。其細胞內的區隔較動物細胞複雜，有很大的液泡，內藏低 pH 的溶液以及蛋白質等『有害』物質。另含有葉綠體及澱粉粒，亦是植物細胞的特徵。不同來源的材料，各有特定的採集或抽取問題，大多需要自行嘗試解決。

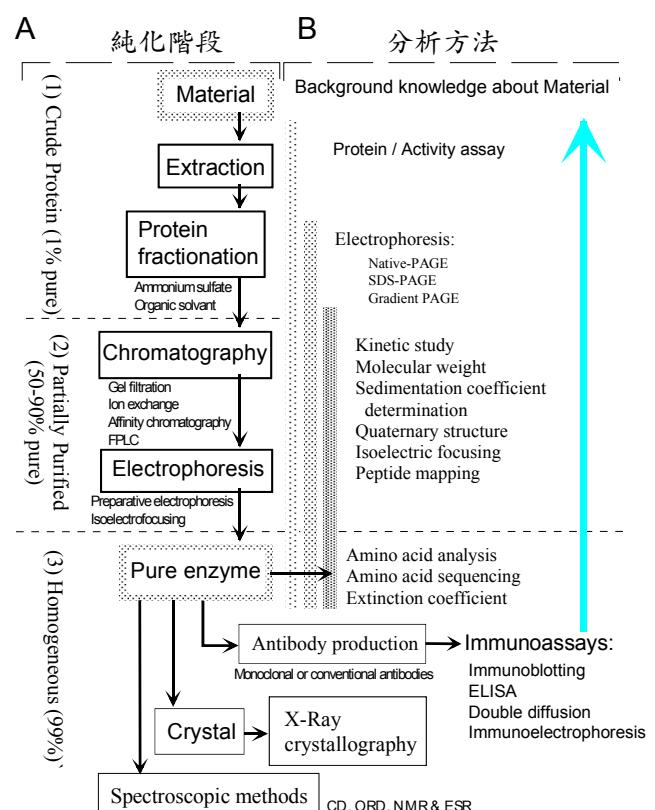


圖 2.1 酵素純化階段與各種分析方法

目標材料之選擇：

- 何種生物來源？
動物、植物、微生物
- 何種組織？
根莖葉花果或組織培養
- 何種胞器？
細胞核、液泡、葉綠體
- 胞內或胞外酵素？
- 水溶性或脂溶性？

c. 材料貯藏：

材料採集後馬上進行抽取，是為上上策；但很多情況下，材料必須冰凍貯存一段時期後，才進行抽取；則應在採集後，儘速置於零下 20°C，若能先以液態氮冰凍後貯於 -70°C 則更佳。冰箱的除霜循環，可能對細胞造成傷害，要特別小心。解凍時要越快越好，但避免局部過熱。有些酵素材料可乾燥起來保存，在無水狀況下，酵素可免受蛋白酶或水分子晶体的破壞；一般用冷凍乾燥法，或製成丙酮粉末。

2.3 均質及抽取：

a. 打破細胞：

目標酵素若在細胞之內，則抽取的第一步驟，就是先打破細胞，有難有易。例如動物的紅血球，只要改變滲透壓即可脹破，但植物的癒創組織就很堅固，要用海砂用力研磨。有些實驗要使用細胞內的胞器 (organelle) 進行，則需以較溫和的方法打開細胞後，再用密度離心法分離各胞器；此步驟難度較高，要參考文獻多試方法。

b. 打破細胞的方法：

就一般材料而言，可能用到的方法列舉如下：

(1) 乾式：不用加緩衝研磨液，直接研磨成乾粉。

液態氮研磨：材料在液態氮中凍結，以研砵打碎材料後研磨成粉。

磨粉機：類似果汁機，原本使用在乾磨中藥藥材。

球磨機 (ball mill)：以小球增加研磨面積，多用在研磨酵母菌粉。

(2) 濕式：都要在低溫下研磨。

均質器：玻璃或鐵氟龍材質，是較溫和的研磨方法。

果汁機 (Waring blender)：每打一分鐘，要間歇數分鐘降溫，重複進行數次。

Polytron：高速電動研磨機，效率極高，目前最常用的均質器。

研砵：磨成細粉後的材料，再加入海砂或玻璃砂助磨；傳統而實用。

玻璃球 (glass bead)：以很細的玻璃球混在樣本中，用力振盪，可打破酵母菌。

超音波震盪 (ultrasonication)：以超音波打破細胞，多用在微生物材料。

French press：將樣本加壓快速通過細孔，以剪力破壞細胞。

c. 提高抽出率：

分泌性的酵素，多散佈在材料中，只要研磨均勻，大多可抽取得。但在均質前，通常都要把材料先切成碎片 (增大表面積)，才容易進行抽取。很多情況下，要先以磨粉機或果汁機打碎，否則抽出率不會很高。材料亦可以液態氮急速冷卻，則組織變得很脆，可以磨得很細，提高抽出率，且可防止酵素活性喪失。注意有些材料不能研磨過度，以免細胞破得太碎。

d. 抽取緩衝液：

均質用的緩衝液体積，通常加入樣本體積的兩倍量以上，以四或五倍為宜，但事先磨成粉末的，有時要加到十倍以上才能均勻懸濁之。可把緩衝液分成二或三次分批抽取，可增加抽出率。

e. 注意干擾物質：

植物材料的均質過程要特別小心，因植物細胞在打破後，會劇烈降低其 pH 值。很多植物材料有含酚化合物 phenolic compounds，在空氣中很快氧化成褐色色素，因吸附性強故難以去除。含量較少者可在緩衝液加入 β -mercaptoethanol，降低催化其生成的酵素 phenol oxidase；量多時則以 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 吸附之 (圖 2.2)。植物本身所含的色素也很難去除，可能會干擾純化步驟。

f. 膜上蛋白質：

有些酵素附著在細胞壁或細胞膜上，不能以普通緩衝液溶出。則可先把材料製成丙酮粉末 (acetone powder)，再加入緩衝液時，稍具水溶性的蛋白質就會溶出；但有時須在緩衝液中，加入界面活性劑 (detergent)，溶出嵌在細胞膜中的蛋白質。常用的有 sodium deoxycholate 或 Triton，因後者屬非離子性分子，較不影響酵素活性及純化步驟，多使用之。

g. 去除混濁物：

均質後可以離心分開可溶與不溶部分，離心不易分開的，可再用過濾法；過濾時可加助濾劑，如 砂藻土 (celite)。離心後，在上清表面可能會有一層浮皮，多為脂質，可撈掉或以紗布過濾掉。

2.4 鹽析及沉澱法：

鹽析沉澱法可分離出樣本中的蛋白質。蛋白質在水溶液中的溶解度，會因溶液中其它鹽類濃度的改變而增減，可利用來沉澱蛋白質。其原理是因於蛋白質分子表面電荷的改變，或者分子上 極性 或 非極性 區域與水分子間作用結果。

2.4.1 鹽析分劃法：

各種蛋白質沈澱方法的原理及應用，在以下各節以圖解 (圖 2.3, 2.4, 2.5) 說明之，並整理在最後的表 2.1。

植物材料的特殊問題：

- 細胞壁：較難打破
 - 葉綠體：特有的酵素
 - 液泡：有許多干擾物質
 - 蛋白酶 (proteases)
 - 多酚化合物 (polyphenols)
- Alkaloid 生物鹼
Flavanoids 類黃酮
Tannins 單寧

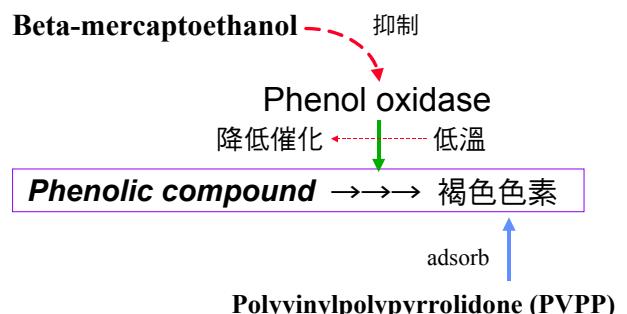


圖 2.2 多酚化合物的生成與防止

a. 鹽溶 (salting in) :

- (1) 等電點 (pI) 為蛋白質電荷性質的指標，若緩衝液的 pH 調至此蛋白質的 pI，則蛋白質分子的淨電荷為零，分子間的排斥力下降，凝聚成大粒子沉澱下來。此時若增加緩衝液的離子濃度 (如加入 NaCl)，則蛋白質的溶解度會漸漸上升，稱為鹽溶。
- (2) 可能是鹽類離子包圍蛋白質表面，與分子上的帶電基團或極性區域作用，進而增加水合效果所造成的。
- (3) 利用前者在蛋白質 pI 沉澱的特性，可純化該酵素，但需注意有些酵素在其 pI 沉澱後，不容易再溶解。

Salting-in:

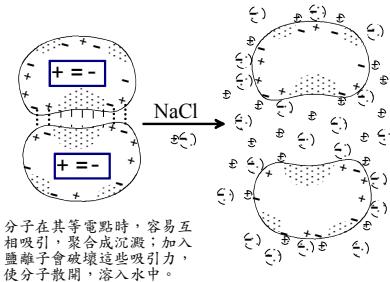
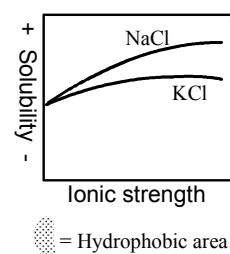


圖 2.3 鹽溶 salting in 方法的原理圖解

b. 鹽析 (salting out) :

- (1) 蛋白質分子表面上 非極性區域附近的水分子，被迫滯留在此區域附近，以便藉此把蛋白質分子溶入水中。
- (2) 若外加入大量離子 (如硫酸銨)，則這些滯留的水分子會被抽出，與新加入的離子產生水合，因而暴露出蛋白質上的非極性區；蛋白質分子間，因此得以非極性基團互相結合，造成大的沉澱粒子，稱為鹽析。

Salting-out:

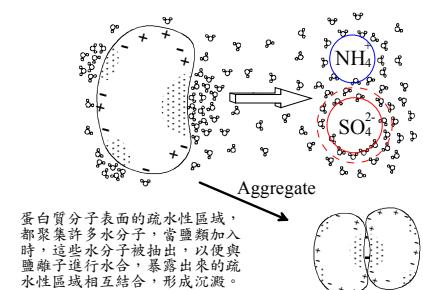
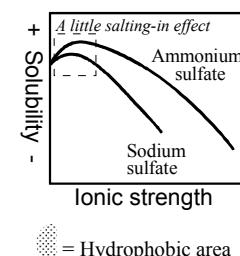


圖 2.4 鹽析 salting out 方法的原理圖解

c. 硫酸銨 (ammonium sulfate) :

- (1) 硫酸銨是一中性鹽，對蛋白質有相當好的安定作用。又因為其離子容積較大，吸走水分子的能力也大，成為有效的鹽析工具。
- (2) 通常硫酸銨的添加以 百分飽和度 來表示 (不是濃度百分比)，例如大部分蛋白質可在 80% 硫酸銨飽和度下沉澱。因為硫酸銨加入的體積很大，會改變最後的總體積，很難由濃度百分比來計算，因此使用百分飽和度作為沈澱蛋白質的度量。
- (3) 饰度隨溫度變化稍有差異，25°C 下的飾度為 4.1 M，即每公升加入 767 克固体硫酸銨；0~100% 之間各飾度的添加量要查表，而不是以 767 克直接乘以其百分比值 (%)。
- (4) 各種蛋白質，因其表面的非極性區域分佈不同，各在其特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱，一般做為初步的純化。

d. 如何使用硫酸銨：

- (1) 硫酸銨容易吸收空氣中的水分而結塊，因此使用前最好先把硫酸銨磨碎，平鋪在烤箱(約60°C)內烘過，切勿過熱。
- (2) 添加硫酸銨時，要在冰浴中進行，不可一次把硫酸銨倒入，而以小量分多次慢慢溶入，並不時攪拌，以免造成局部濃度過高。硫酸銨全加完後，再攪拌約10~30 min，使溶解完全平衡，然後進行離心，注意所要的是沉澱或上清，要弄清楚！
- (3) 最後所得的沉澱溶解在最少量的緩衝液中，或者以沉澱形式保存，均相當安定；但要記得其中所含的硫酸銨，是否對下一步檢定或純化有影響，可以透析法除去之。

2.4.2 有機溶劑沉澱法：

a. 降低水活性：

若在蛋白質溶液中加入有機溶液，如丙酮或乙醇，因稀釋水濃度而降低水活性，則蛋白質上親水性區域的水合度降低，開始聚集在一起，產生沉澱。也可看作有機溶劑降低溶液的介電常數，使蛋白質的溶解度降低。應當注意，有些細胞膜上的蛋白質，本身含有很多疏水性區，在有機溶劑中反而易溶。

b. 使用有機溶劑：

要先把溫度降至零度左右，緩緩加到蛋白質溶液中，並一邊攪拌使生沉澱。以丙酮為例，大多以20~50% (v/v)濃度來沉澱蛋白質；注意其中的v/v乃指加入前的體積；因丙酮與水混合後，體積會稍微縮小。溶液中若有高濃度鹽類，則會影響沉澱行為，以0.05~0.2 M離子強度為限度。

c. 沉澱收集：

此法所得的沉澱粒子較大，以重力沉降即可收得沉澱，但一般仍以離心收集，以增加回收，並可去除丙酮。蛋白質沉澱可涼乾，或在布氏漏斗中以少量乙醚洗過製成粉末；所得沉澱中的有機溶液並不多，通常並不影響下一步驟。

2.4.3 其它處理法：

a. Polyethylene glycol (PEG):

- (1) PEG是一種水溶性的高分子聚合物，分子量4,000以上的PEG可以用來沉澱蛋白質，其作用原理類似有機溶液，但使用濃度較低。
- (2) 較麻煩的是PEG不易由蛋白質沉澱中除去，幸而PEG通常並不影響下一步純化步驟。

Organic Solvent Precipitation:

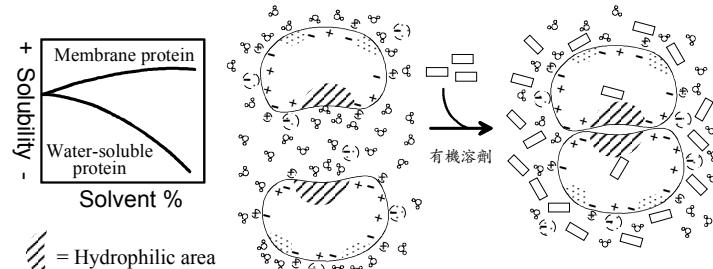


圖 2.5 有機溶劑沈澱法的原理圖解

b. 去除核酸及多醣：

- (1) 樣本溶液中若有大量核酸，可以加 protamine sulfate 與之產生沉澱，再以離心去除之。
- (2) 碳水化合物較難完全去掉，通常期望在蛋白質沉澱時，或往後的層析法能去除。二者都可以用對應的水解作酵素分解，但價錢昂貴。

c. 特殊處理：

有些較特別的酵素，具有特殊性質，可利用在純化上。例如 RNase 對熱非常安定，可耐得 100°C ，因此可把粗酵素液加熱煮沸，除去其它蛋白質。對強酸、強鹼或有機溶劑的特殊安定性，亦可利用之。不過使用這些嚴苛的處理方法時，要特別小心控制好其正確條件。

表 2.1 各種鹽析及沉澱法的比較：

	Salting in 鹽溶	Salting out 鹽析	有機溶劑沉澱
影響因素	蛋白質分子表面的帶電基團	蛋白質分子表面的非極性基團	除了 hydrophobic 之外的其他作用力
試劑	NaCl (單價離子)	硫酸銨 (兩價離子)	甲醇、丙酮等有機溶劑
發生機制	蛋白質在其 pI 下，因淨電荷為零而聚集沉澱；若加入鹽類，會阻礙其聚集而增加溶解度。	硫酸銨的兩價離子，在溶液中搶走附在蛋白質表面 (非極性部分) 的水分子，使得非極性部分相互吸引而聚集沉澱。	降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，而聚集在一起。
圖	圖 2.3	圖 2.4	圖 2.5
其它說明	對較低濃度緩衝液進行透析是 salting in 的反向過程。	1) 非極性蛋白質較早沉澱下來。 2) 在硫酸銨中蛋白質相當穩定。	1) 部分蛋白質會變性。 2) 有助沉澱的因素：蛋白質分子量大、緩衝液 pH 靠近 pI。 3) 脂溶性蛋白質的溶解度反而增加。

3 色層分析法：

3.1 色層分析法原理：

a. 系統組成：

層析系統的兩個主要組成為 固定相 (stationary phase) 及 流動相 (mobile phase)，二者各有不同的極性或非極性強度；樣本分子因其自身極性的強弱，與此二相之親和力不同。與固定相親和力大者，易留滯原地；與流動相親和力大者，易隨流動相移動，因而達成分離的目的。圖 3.1 以圖解說明此一機制。

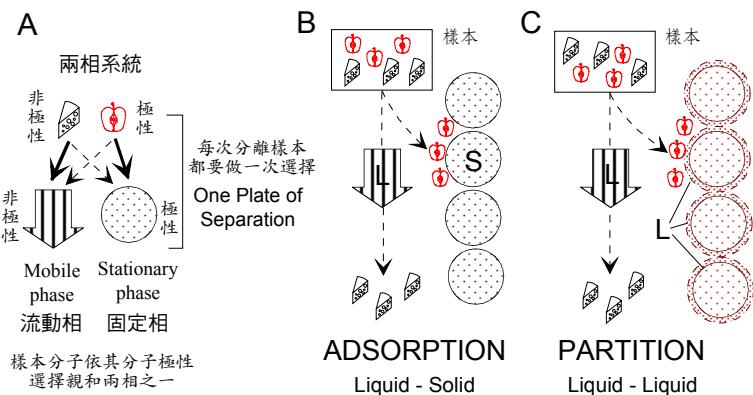


圖 3.1 色層分析方法的基本原理圖解

b. 極性大小：

這種親和力的產生，決定於樣本或兩相物質之化學本質，是屬極性或非極性，而遵循『Like dissolves like』的原則；即極性分子易溶入極性的固定相或流動相，非極性分子則易溶入非極性者；一個樣本分子，則依其極性大小在此兩相間做選擇。

c. 方式很多：

因固定相或流動相可能是 固 (S)、液 (L) 或 氣 (G) 相之一，故有多種方式：

Partition chromatography:	固定相 (L)	流動相 (L)	例：PPC, TLC, 膠體過濾
Adsorption chromatography:	固定相 (S)	流動相 (L)	例：TLC, 離子交換
Gas-liquid chromatography:	固定相 (L)	流動相 (G)	例：GC

d. 常用的層析方法：

表 3.1 各種大小分子的色析法應用：

適用於	Partition	Adsorption
小 分 子	Paper partition chromatography Thin-layer chromatography 反相層析法, GC	離子交換法 Thin-layer chromatography GC
大 分 子	膠體過濾法 反相層析法	離子交換法 親和層析法 疏水性層析法 (HIC)

◆ 我們只討論大分子的層析法

3.2 膠體過濾法：

3.2.1 原理概述：

膠體過濾屬 partition 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為膠体孔隙內的緩衝液。溶質（樣本蛋白質）根據其分子量的大小，決定分佈在這兩相的比例。分子量大的不易進入膠球，隨流動相溶離；分子量小的，則易竄入膠球內的固定相，而被延滯流出膠柱（圖 3.2）。分子的形狀、大小均為影響因素，即與其分子半徑（Stokes radius）有關，與分子量不完全成正比關係；但一般均視蛋白質為球形，故其形狀較無影響力。

3.2.2 膠体介質 (support, matrix) :

膠体介質是三次元的網狀小球，由長鏈聚合物交織而成，有三大類不同材質。

a. Dextran :

是葡萄糖組成的多醣長鏈，經過架橋修飾，成為內部有均勻孔道的小球。由 Pharmacia (瑞典) 開發的產品有下面數種：

- (1) Sephadex G 系列：是最早推出的介質，有各種適用分子量範圍，如 G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 等，數字越大，表示膠球孔徑越大，其適用的分子量就越大。注意 G-150 以上的膠体，在高壓下會被壓垮而使流率變慢，甚至無法流通，應改用 Sephacryl 或 Sepharose 系列。G-25 以下者，可為蛋白質脫鹽 (desalting) 用。
- (2) Sephacryl S 系列：額外使用 Bis 做架橋支持，因此比 Sephadex 有更好的耐高壓能力。有 S-200, 300, 400, 500, 1000 等不同孔徑，適用分子量大的樣本，但注意它有很高的非專一性吸附，要小心蛋白質被『吃掉』！最好用鹽濃度較高的溶離緩衝液 (0.2 M NaCl)。
- (3) Sephadex LH 系列：Sephadex 上的 OH-基團被修飾成 hydroxylpropyl 衍生物，成為 LH 系列，疏水性較大，可兼用在極性或非極性緩衝液。

b. Agarose :

洋菜醣是由海藻抽出的直鏈聚醣，長鏈分子間以氫鍵架橋，形成三次元膠体，可以濃度來控制孔徑大小。故有些 agarose 材質的膠球，不能加高熱，否則會融成一塊膠片（如培養用的洋菜膠）；用在分子量特大的分子（如核酸）或粒子（如病毒）。

- (1) Sepharose 及 Sepharose CL 系列：CL 系列特經架橋反應補強，可耐高壓高溫。各有 2B, 4B, 6B 三種，數字表示含膠百分比，數字越大孔徑越小，與 Sephadex 相反。

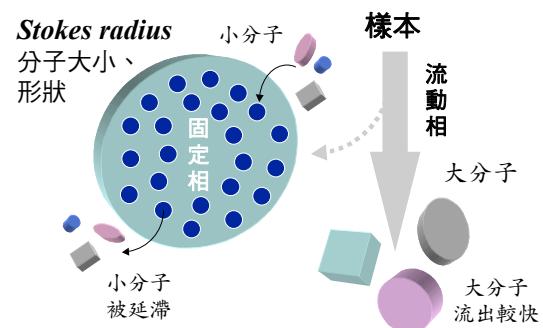


圖 3.2 膠體過濾法的原理

(2) Bio-Gel A 系列：Bio-Rad 有 A-0.5M, A-1.5M, A-5M, A-15M, A-50M, A-150M，數字表示其所適用的最高分子量，以百萬為單位。

c. Polyacrylamide :

像電泳膠體一樣，有固定大小的孔徑，經製成小球，供層析分離之用。商品為 Bio-Gel P 系列 (Bio-Rad)，有 P-2, P-4, P-6, P-10, P-30, P-60, P-100, P-150, P-200, P-300 等，最高可使用在分子量 300,000 者，高壓之下的流速亦會變慢。

d. 膠球大小：

(1) 膠球粒有一定大小，一般可分為 coarse, medium, fine, super fine 四種粗細 (grade)；越粗的膠体，流率越好，但解析力越差。因膠球外面的緩衝液是由膠球表面向內擴散，樣本蛋白質也是以擴散方式進入膠球，再由中心向外擴散出來，因此膠球半徑越大，擴散距離越大，效果越差。

(2) 下圖 3.2 說明這種傳統擴散式介質的機制。而近年來因材料科學的進步，發展出通透性特強的膠球，緩衝液可直接浸潤而進入膠球，不需經擴散作用，是為 dispersion 濾散式的膠体，效果較好且快速。

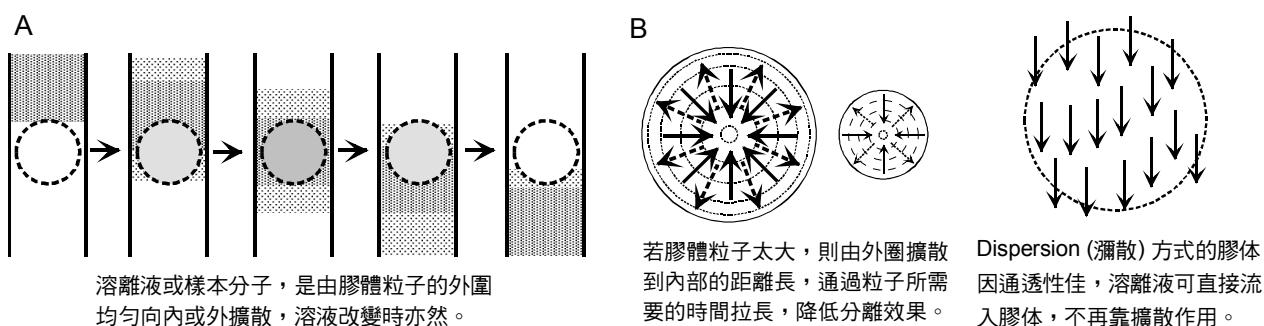


圖 3.3 溶離液是以擴散方式進出膠體

3.2.3 膠体管柱：

a. 管柱性質：

膠体過濾都以管柱方式進行，不論使用何種介質，管柱的性質大致可以預測 (圖 3.4)：當管柱裝填完成，若膠柱總體積為 100 mL (total volume, V_t)，則膠柱內液相總體積約 90 mL (liquid volume, V_l)，其中流動相的體積 (即介於膠球之間的緩衝液總體積, void volume, V_o) 約為 35 mL，樣本分子則應於 35~90 mL (V_e) 間溶離出來。如同 TLC 的 R_f 值，膠体過濾也有表示樣本溶離程度的指標 (K_{av})；樣本的 K_{av} 與分子量成反比，因此可用來作分子量的測定。現在多直接以溶離體積表示樣本溶離程度。

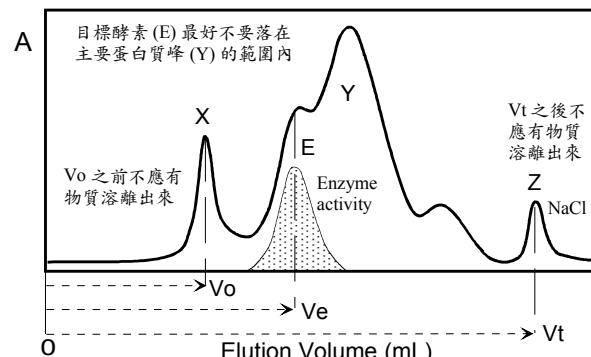


圖 3.4 膠體過濾法的典型溶離圖譜

b. 內在因素：

膠體過濾法在操作時，有些內在的問題，會影響結果的好壞：

- (1) 擴散及亂流：由於是在液相中進行，樣本在膠柱中的擴散現象相當顯著；又因液体在膠球間流動時，受重力及對流的影響，會造成亂流。擴散及亂流都會使膠體過濾的解析力降低甚多。
- (2) 管柱設計不良：經常是致命的傷害，例如無效空間 (dead volume) 過大、緩衝液進入膠體時流動不均、溶離液出口端的管路太長或太粗等。

c. 解決擴散及亂流：

若降低膠球粒子的大小，則可改善之；因此越細的膠球，其解析力就越佳。但膠体若太細，會造成流速下降，則要用更大的壓力進行溶離，許多膠体耐不住如此高壓。因此若補強膠体材質，以架橋來支持膠体構造，或改用矽膠質為材料，可改善流率並增加解析力，即成為 HPLC 系統。使用上述的 dispersion 式膠體，也是解決方法。

d. 膠体的選擇：

取決於所要分離蛋白質樣本分子量的大小，並且預期溶離出來的蛋白質峰，可出現在 V_o - V_t 區間的前半段，以降低因擴散所造成的不利影響（使目標蛋白質早些溶離出管柱）。通常分子量大於十萬可用 Sepharose CL 系列，小於五萬者用 Sephadex G-100 以下，其間則使用 Sephacryl S-200 或 300。避免使用 Sephadex G-150 或 200，因其流率不佳；其它廠牌相對應的產品，亦可使用之。

e. 管柱大小：

視所要分離樣本的體積而定，一支膠体體積為 100 mL 的管柱，可分離 1~3 mL 樣本。膠体過濾管柱以細長較妥，通常直徑為 1.6 或 2.6 cm，長度 80~100 cm，太長者擴散作用明顯。大量生產時，製備式管柱多使用矮胖型，以增加流率。

f. 管柱系統：

完善者包括下列各部分（圖 3.5）：

緩衝液 (1) → 幫浦 (2) → 管柱 (3)
→ 監視器 (4) → 分割收集器 (5)

其中監視器並非必需，管柱種類很多，上等備有 adaptor 可降低無效空間，且使用上方便許多。通常要在冷房中操作，因此儀器的維護要更小心；取出冷房後要立刻在乾燥環境下烘乾回溫，以免潮濕造成短路或發霉。梯度製造器使用在離子交換。

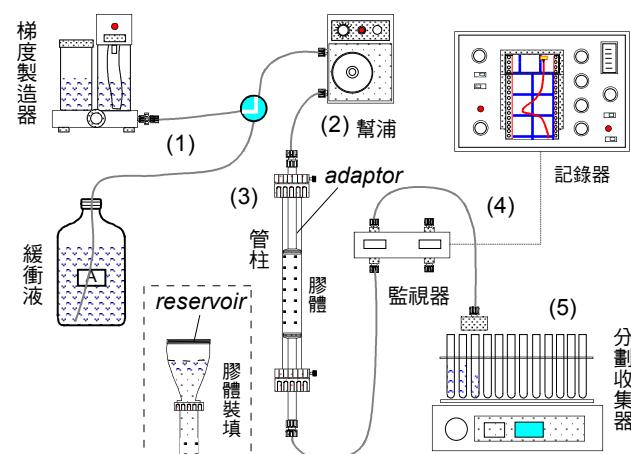


圖 3.5 液相層析管柱系統

3.2.4 管柱操作：

a. 膠体處理：



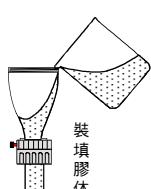
許多膠体是乾燥粉末，使用前要先行膨潤，如 Sephadex, Bio-Gel P；其餘如 Sephacryl, Sepharose (CL), Bio-Gel A 均為已膨潤者，直接在玻璃漏斗以緩衝液洗過即可裝填；若有需要，可以減壓幫浦抽去氣泡。注意 Sepharose 及 Bio-Gel A 不可加熱或高壓滅菌。由管柱大小算出所需膠体的體積，再加一成。

b. 膠体裝填：

以下是裝填膠柱的詳細步驟，最好實地觀看示範操作或錄影帶。



(1) 洗好的膠体浸在緩衝液中，靜置過夜使之沉降，把上清部份的體積調為膠体體積的一半 (左圖 膠体佔三分之二)。



(2) 先把各儀器連結好，確定可正常運作，架好管柱，注意要確實垂直地面。

(3) 若要裝填較高的膠柱，則要裝上 reservoir，否則最多只能裝填七成高管柱。

(4) 先在管柱內加一些緩衝液 (約 5 cm 高)，看能否順利流出，關住出口。

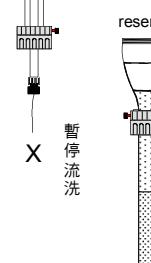
(5) 把上述膠体攪拌均勻，成為懸濁液，但勿產生氣泡。

(6) 沿著管柱的管壁，慢慢倒入膠体；勿粗魯灌入，以免生成氣泡 (左圖)。

(7) 一口氣倒完後，等約 1 min 後打開出口，膠体開始沉降。

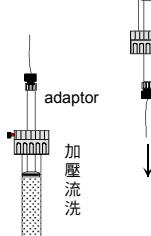
(8) 不久整隻管柱分成三層 (左圖)，最上為澄清的緩衝液，下層為已堆積好的膠体，顏色較白，中層為尚未沉降的膠体。勿使上方緩衝液層乾掉。

(9) 膠体完全沉降後，應得到預計的膠体高度，否則要追加或挖去膠体；要添加膠体時，先把膠柱上方約 5 cm 高的膠体均勻懸濁後再加入。



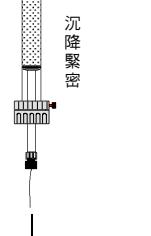
(10) 除去 reservoir，加上 adaptor，注意系統中不能有任何氣泡 (左圖)。這個步驟較易出問題，請仔細研究清楚所有細節，小心練習好才進行。

(11) 連通整個系統，檢查系統的封閉性，調整幫浦流速。



(12) 以較高的流速洗 (45 mL/h, 約 150% 流速)，以平衡完全。通常膠体裝填時的流率，要比操作時稍高；Sephacryl 則要更高流速，但當使用 Sephadex G-100 以上者，只能用平常流速，否則膠体會被壓垮。

(13) 膠体面可能會下降，adaptor 要再往下壓，以完全接觸膠面。



(14) 以正常流速 (約 30 mL/hr) 流洗數小時，可洗過夜，同時準備樣本。

c. 樣本體積：

(1) 体積限定在膠柱體積的 1~3%，可加甘油增加密度。

(2) 有 adaptor 的管柱較方便，可用幫浦注入，否則要直接把樣本加在膠体表面上。吸去上方緩衝液後，小心注入 (乾式)；或不吸去緩衝液，把密度較大的樣本，在緩衝液中直接加入，讓它自動沉降在膠体表面 (溼式)。

(3) 樣本溶液不可有沉澱，否則要先離心除去之，太濃或太稀均不適宜。注

入樣本應極為小心，勿破壞膠體表面！

d. 溶離速度：

以直徑 1.6 或 2.6 cm 管柱而言，通常每小時流速約 30 mL 左右，較粗的管柱可加快，Sephadex G-150 或 G-200 要減慢，而 Sephacryl 溶離速度可加快一倍。收集約定在每 2-5 mL 一分割，但可依情況自行增減，最好使用分劃收集器，讀滴數、秒速均可；要注意勿讓膠體乾掉，也要小心收集器很容易出毛病。

e. 管柱保存：

- (1) 膠體暫不使用時，可在緩衝液中加NaN₃ (0.01%) 流洗一次，關好出口。
- (2) 長期不用時最好取出膠體，在玻璃漏斗中以PBS洗過數個體積後，保存在 4°C 中，再加數滴NaN₃防菌。
- (3) 若發覺膠體太髒，可用 0.2 M NaOH 或 NaCl 先洗過，再以緩衝液平衡；再度取出使用時，要注意有沒有長霉（黑色棉絮狀小球），膠體有無結塊。
- (4) 已膨潤的膠體應貯於 4°C，但切勿貯藏在零下的溫度，膠體結構會破壞掉；乾粉或未尚未開封者，可貯於室溫。
- (5) 膠體外表看來都一樣，一定要標示好，以免混淆不清；千萬不要把兩種膠體混在一起，結果會很淒慘！

3.2.5 問題及解決：

a. 管柱裝填：

膠柱是否良好，可跑 Blue Dextran (Pharmacia) 試之，藍色色帶應平穩地往下移動，色帶厚度會稍加寬，但不該有拖尾、變斜，甚或成為不規則亂流！也可用手電筒在管柱後方打光，看膠體中有無氣泡。

b. 溶離緩衝液：

流速太快會造成分離結果不好，通常是色帶拉長或呈現不規則。緩衝液中的離子濃度有相當影響，通常不能使用蒸餾水來溶離。樣本分子在通入膠體後不久，其緩衝液即被管柱中的緩衝液所取代；若此二種緩衝液不同，則因離子濃度的改變，某些蛋白質可能會鹽析出來，沉澱在膠面。

c. 活性消失：

有些樣本蛋白質，需要金屬離子、輔酶、輔因子等小分子，共同達成其活性，在通過管柱後，可能被排除而失去活性。可在活性分析時補充，或可在溶離緩衝液中添加。若回收量太低，注意膠體有無吸附現象。

d. 使用溫度：

膠體管柱由冷房移到室溫後，會漸生成小氣泡，不能再用。由高溫處移至低溫處時，則無此問題。緩衝液也有同樣現象，應當注意。

e. 老舊膠柱：

管柱經長期未使用，要注意有無長霉，管柱有無乾裂(用手電筒檢查)。使用太多次數後，膠柱最上方的表面會有沉澱或變得較髒，可稍挖去表層，再小心輕輕攪拌，使膠体表面重新沉降平整，對結果影響不大。

3.3 離子交換法：

離子交換法乃利用分子的帶電性質進行分離，解析力好且具多樣性，是重要而應用極廣的純化方法。

3.3.1 原理概述：

a. 離子交換法：

是一種 adsorption 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為介質擔體表面的帶電基團。樣本中各種離子，與介質表面帶電基團間的親和力強弱不同，吸附上去之後，可使用不同離子濃度的緩衝液，分別溶離出這些成分(圖 3.6)。

b. 兩大類離子交換介質：

由介質帶電基團的不同，可分為兩大類：介質-帶電基團 (counter ion)

- 1) 陽離子交換介質 (cation exchanger)： 擔體-陰離子基團 陽離子
- 2) 陰離子交換介質 (anion exchanger)： 擔體-陽離子基團 陰離子

c. Pecking order :

離子交換的進行，可視為各種 counter ions 間，對擔體介質上帶電基團的爭奪戰，離子(包括蛋白質)競爭著佔到固体介質上；其競爭優勢順序如下(圖 3.7)：

- (1) 帶電荷高者取代帶電荷低者。
- (2) 電荷相同時，原子序(或離子體積)大者優勢。
- (3) 濃度可克服以上兩種優勢，高濃度氫離子可取代其它陽離子。

d. 離子取代優先順序例：

陽離子： $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

陰離子： $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^-$

3.3.2 離子交換介質：

a. 介質種類：

- (1) 離子交換介質的種類很多，歸納起來分為陰離子及陽離子兩大類；每一類又依其帶電基團的強弱，分為強、中、弱三種。

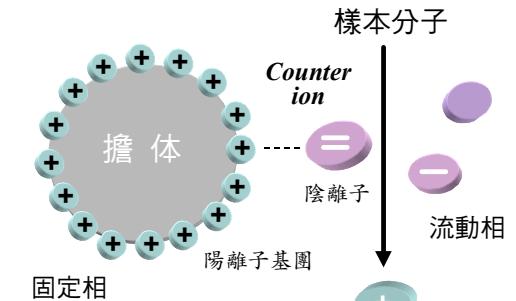


圖 3.6 離子交換法原理

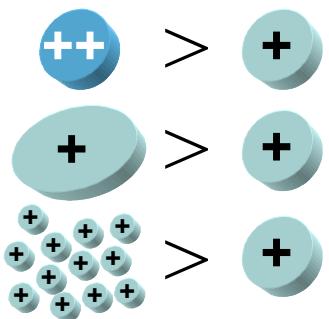


圖 3.7 離子取代順序

- (2) 另外依介質的材質不同，略分為 合成樹脂 (resin) 及 聚醣 (glycan) 兩種，前者對蛋白質的純化並不適用，只用在小分子樣本的分離上。
- (3) 聚醣多使用 Sephadex, Sepharose, cellulose 等為擔體，在糖分子加上帶電基團；而 cellulose 又有做成結晶球形的 Sephacel，可增加膠柱的流率。

表 3.2 各種離子交換介質

陰陽強弱分類		Resin / Polystyrene		Glycan / Cellulose (= X)	
Anion Exchanger	Strong	Dowex-1 Dowex-2	$^+NR_3$	TEAE-X (QAE-X)	$-NR_3^+$
	Weak	Dowex-3 IR-45	$^+NHR_2$	DEAE-X	$-OCH_2CH_2NHR_2^+$
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$-SO_3^-$	Phospho-X	$-PO_4^{2-}$
	Weak	IRC-150	$-COO^-$	CM-X	$-CH_2COO^-$

X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

b. 選擇交換介質：

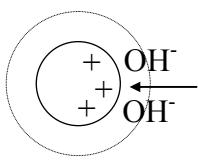
- (1) 若已知樣本蛋白質的 pI，則先選擇適當緩衝液的 pH，使蛋白質帶有正 (或負) 電，而採用陽 (或陰) 離子交換介質。
- (2) 若尚不知樣本的 pI 時，則可用試管裝少量介質，在各種緩衝液 pH 下，加入樣本蛋白質，然後測上清中有無酵素活性，即得知樣本蛋白質有無吸附上去，可選得適當的介質及緩衝液 pH。

c. 一般使用：

- (1) 通常在純化蛋白質時，都使用較弱的離子交換介質，如 DEAE 或 CM；介質則用聚醣類為材料，多使用 Sepharose CL-6B 或 Sephacel，而不用體積變化太劇烈的 Sephadex，或流率較差的 cellulose。
- (2) Sepharose 本來有膠體過濾的作用，應用在離子交換時，作用並不明顯；但在分離異構酶時，因各個異構酶的分子量相近，不要使用。
- (3) DEAE 型膠體使用的 pH 不能高過 9，CM 者不能低於 pH 6，否則介質會失去原先帶有的電荷。

d. 介質容量有限：

- (1) 離子交換介質與蛋白質的結合量有一定限度，稱為該交換介質的 容量 (capacity)；若超過此一容量，多出的樣本會直接流出。
- (2) 交換介質的結合容量大小，受層析條件不同、蛋白質種類不同、緩衝液不同、pH 或離子濃度不同等，有很大的差異。如 DEAE-Sepharose CL-6B 每 100 mL 可結合 11 克白蛋白，但對 ferritin 只有 0.4 克。



e. 介質表面的微環境：

- (1) 由於交換介質的帶電性，其微視環境中的 pH，並不成成為一均勻的狀態。
- (2) 緊靠近介質表面的 pH，要比外圍緩衝液的 pH 相差一個 pH 單位左右：陰離子交換介質高一個單位，陽離子者低一個單位 (稱為 Donnan effect)。

f. Hydroxylapatite :

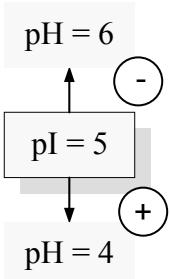
- (1) 可與 DNA 或 RNA 結合，原本用在分離單股與雙股 DNA，是一種結晶型的磷酸鈣，其作用機制不很清楚，但顯然與其帶電性質有關。
- (2) 操作法與離子交換法類似，在低離子濃度時使蛋白質結合上去，再以高濃度溶離下，但較複雜；不同的鹽類 (如 磷酸鹽, NaCl或CaCl₂)，會有不同的溶離結果，要以實驗嘗試求得。

3.3.3 緩衝液與層析系統：

a. 緩衝液種類：

可能會影響離子交換結果，例如 DEAE 介質若使用磷酸緩衝液，則其中的磷酸根離子 (帶兩個負電) 與交換介質的結合力相當強，會影響樣本蛋白質的結合。但反過來說，此時能夠結合上去的離子，一定有相當的強度。

b. 緩衝液的 pH :



- (1) 可定在樣本蛋白質 pI 的上或下一個 pH 單位，使樣本分子帶有正確電荷，能夠結合到所選用的介質上去，但又不會太強，以免難以溶離下來。
- (2) 用酸鹼度溶離時，當緩衝液的 pH 趨近樣本分子的 pI 在 0.5 pH 單位以內，蛋白質會開始溶離出來。
- (3) 所用緩衝液的離子濃度，在不影響蛋白質與介質的結合能力下，儘量採稍高的濃度，以降低非必要性的吸附，通常在 10~100 mM (NaCl) 之間。

c. 膠体 pH 要平衡好：

決定緩衝液的 pH 與離子濃度後，交換介質要先平衡在此緩衝液中，如膠体過濾法一樣，可在玻璃漏斗中進行。為加速平衡達成，交換介質可先用 10×濃度緩衝液浸泡沖洗，然後再用 1×者澈底洗過。

d. 管柱系統：

離子交換法所用的管柱系統，其要求比膠体過濾法嚴格，最好使用附有 adaptor 的 Pharmacia 管柱 (K 或 C column)，可降低 無效空間，避免梯度破壞。與膠体過濾相反，多使用矮胖型的管柱，太長並無必要。

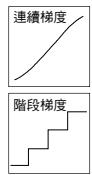
e. 膠体裝填：

裝填方法與膠体過濾法一樣，但要求反較不嚴格；裝填完成後，要以緩衝液洗過數個體積後方可使用。不能使用 Blue Dextran，只用手電筒檢查有無氣泡。 Sepharose 或 Sephadex 介質可耐高流速的壓力，但流速過快可能影響解析力。

3.3.4 管柱操作方法：

a. 樣本蛋白質液：

樣本必須平衡在管柱所使用的緩衝液中，否則要先對緩衝液透析。樣本溶液的體積並無限制，因蛋白質會結合到交換介質上，溶離下來時有濃縮效果；若目標蛋白質不吸附到介質，而直接通過交換介質，則其條件同膠体過濾法。

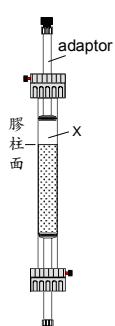


b. 溶離方法：

(1) 可用 pH 或 鹽 梯度；溶離方式有 連續梯度 (continuous gradient) 及 階段梯度 (stepwise gradient)。

(2) 但 pH 的連續梯度不容易拉得好，因此一般較少使用，可改用階段梯度，或 色層焦集法。

(3) 由於是以濃度的梯度來溶離，因此在離子交換管柱中，膠体上方不能積有緩衝液層 (無效空間，如左圖 X 所指)，否則做好的梯度會在此處破壞，失去梯度的連續性；因此離子交換管柱最好能使用 adaptor。



c. 梯度體積：

會影響結果，通常溶離體積較大時，解析度較佳；但體積太大時，會使溶離出來的蛋白質濃度變稀。而梯度的上下範圍 (如 0~0.3 M NaCl) 也要適當，範圍太寬或太窄，均會降低解析度；都要以實驗試出最佳條件。

d. 膠体再生：

(1) 蛋白質全部溶離出來後，交換介質要經過 再生 (regeneration) 後，才能再次使用。

(2) 以 1~2 M NaCl 即可洗去雜蛋白，澈底清洗可用 0.1 M NaOH 流洗；陰離子交換介質可用 1 M 醋酸鈉 (pH 3.0) 洗 1.5 個體積；再以緩衝液平衡完全，才能再度使用。

(3) 可測流出液的 pH 或離子濃度，是否與加入的緩衝液一樣。也可把膠体取出，在燒杯或漏斗中澈底清洗。大多數失敗是因於 再生不良！

e. 批次法：

離子交換法不一定要在管柱中進行，也可在燒杯中以 批次法 (batch) 吸附並溶離蛋白質，一般應用在工業上的大量純化，其效果較差。

3.3.5 色層焦集法 (chromatofocusing)：

a. 也是一種離子交換法：

(1) 若非使用 pH 梯度進行溶離不可，則可改用 Pharmacia 發展的色層焦集法。此法使用類似 DEAE-Sepharose 的陰離子交換介質 (polyethyleneimine agarose)，在管柱中以特殊的緩衝液 (Polybuffer) 流洗以形成 pH 梯度。

(2) Polybuffer 中含有如同 等電焦集法 所使用的 ampholyte，以較低的 pH 通入

管柱，與介質上面的鹼性基團中和，由酸（上方進入管柱處）漸鹼（出口處），直接在管柱中形成 pH 梯度。

b. 作用機制：

樣本蛋白質進入色層焦集管柱後，先遇到較高 pH 環境（介質），通常高於其 pI 而帶負電，因此會結合到介質上。當 Polybuffer 開始注入管柱，降低環境 pH，使樣本分子失去負電荷而溶離下來；蛋白質便依 pI 大小順序，pI 高的先溶離出來；同時會集中在其 pI 的地方，成為一條極細色帶，故稱為焦集法。

c. 注意發生沉澱：

有些酵素若處在其 pI 的環境，會發生不可逆的沉澱而失去活性，則不適用以 pI 為分離基礎的純化方法。一般較少使用色層焦集法，除非一定要以 pI 或 pH 梯度來作分離，否則儘量採用其他方法。

3.4 親和層析法：

兩蛋白質分子間親和力之形成機制，請參閱 B1 生物化學 p.68 及 p.86。

3.4.1 原理概述：圖 3.8 說明此純化過程之原理。

a. 固定相為親和基團：

- (1) 親和層析法的固定相為一固相擔體，上有專一性親和基團 (A)，流動相為溶離緩衝液。
- (2) 當樣本通過管柱時，與親和基團有專一性的分子 (B) 結合到固定相上，非專一性分子 (X) 則隨流動相洗出管柱。
- (3) 留在定相上的分子 (B)，可用酸或鹼溶離，或用專一性游離分子溶離。

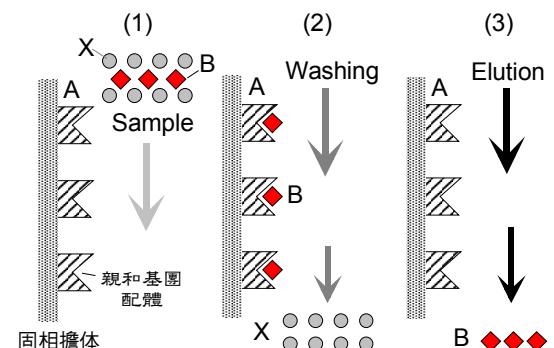


圖 3.8 親和層析法的作用機理

b. 親和法四項要素：請參考圖 3.9

- (1) 對所要純化的物質 (B)，需有專一性配體 ligand (A)，而 A, B 之間要有專一性的親和力，其解離常數 (K_d) 約在 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ 。
- (2) 配體 (A) 能方便而大量取得，且能經由耦合反應接到固相擔體上，成為固定相。
- (3) 擔體具有可與配體連結的基團，且非專一性吸附力低，通透性良好。
- (4) A-B 結合成的複合體 (complex)，可以方便地解離，而不傷害 A 或 B。

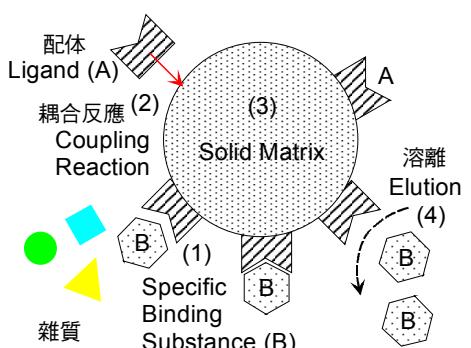


圖 3.9 親和層析法的各項要素

3.4.2 親和吸著劑：

a. 固相擔體：

材料種類很多，舉凡 洋菜糖 (agarose)、纖維素、玻璃砂、幾丁質、合成聚合物 均可使用；但用在蛋白質，仍以聚糖類為最佳。以 Sepharose 為例，可自行用 CNBr 活化，使糖分子接上 $-O-C\equiv N$ (cyanate ester) 基，再與配體上的氨基反應。

b. 親和性介質：

表 3.3 可與各種配體基團反應的介質 (Pharmacia) :

配體基團	親和性介質	反應基團	反應方式
	CNBr-activated Sepharose 4B	$-C\equiv N$	直接反應
$-NH_2$	CH-Sepharose 4B 或其活化型	$-COOH$	加 EDC*
		N-OH-succinimide	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
$-COOH$	AH-Sepharose 4B	$-NH_2$	加 EDC*
$-OH$	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
$-SH$	Thiopropyl-Sepharose 6B	$-S-S-R$	DTT 活化
	Activated Thio-Sepharose 4B	$-G-S-S-R$	直接反應

* EDC = *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl

c. 共價層析法：

使用 Thio-Sepharose 時，樣本蛋白質以 共價鍵 (雙硫鍵) 結合到親和介質上，然後再以 cysteine 或 mercaptoethanol 溶離下來；此法可以用來純化 papain 或如 urease 等含 $-SH$ 基的蛋白質，特稱為 共價層析法 (covalent chromatography)。

d. 耦合反應：

- (1) 介質與配體的 耦合反應 都相當簡便，介質先經緩衝液洗過後，加入配體溶液反應後，再加入填塞分子，除去介質上未完全反應的基團，裝入管柱流洗後即可使用。
- (2) 注意耦合緩衝液及樣本液中，不能含有會競爭耦合反應的分子；例如使用 CNBr活化的Sepharose時，不可用Tris或glycine緩衝液 (有 $-NH_2$ 基)。

e. 注意 spacer arm：

有些親和層析法使用 spacer arm 來降低配體的立體障礙，但是 spacer arm 多為六到八碳的碳氫鏈，有相當強的非極性，若表現出疏水性層析的作用 (見下節)，則可能對純化效果有正或負面的影響。

f. 現成的親和吸著劑：

利用以上各種介質，可自行接上有用的配體，進行親和層析法；但商品售有很多已經接好配體的成品，使用上更方便，例舉於表 3.4。

表 3.4 各種親和性介質及其專一性基團：

配 体	親和性分子	說 明
抗体	對應之抗原	免疫吸著劑，大多自行合成
基質或抑制劑	對應之酵素	酵素的專一性結合
Protein A	部分 IgG	單株抗体純化
Con A	醣蛋白	對 α -D-葡萄糖、甘露糖基有專一性
Heparin	凝血蛋白等	Heparin Sepharose CL-6B
Oligo (dT)	mRNA	Oligo (dT)-cellulose
Cibacron-Blue	NAD(P) ⁺ 結合酵素	Blue Sepharose CL-6B
AMP 或 ADP 等	同上	5'AMP-, 2', 5'ADP-Sepharose 4B
單糖及其衍生物	Lectin	用來純化 lectin

3.4.3 金屬螯合層析法：

- a. 許多蛋白質或酵素分子上帶有金屬離子，則此蛋白質可能會吸附該金屬。
- b. 若把某金屬固定到固相擔體上，則此擔體將會專一性地吸附需要此金屬的蛋白質。
- c. 基因操作時，經常在表現蛋白質的端點，加上一段含有六個 His 的片段；則此表現蛋白質，可以吸附到含有鎳的吸著劑上，可以 imidazole 流洗出來（圖 3.10）。
- d. 這種擔體上結合有某些可與金屬產生配位鍵的基團（如 nitrilotriacetic acid），這些基團與金屬離子結合（如鎳離子）後，即可成為親和吸著劑。

3.4.4 疏水性層析法：

a. 作用機制：

- (1) 蛋白質分子表面有部份疏水性區域，若在一極性很強的環境中，則會被吸附在非極性的固定相擔體上；若環境的極性降低，則可被溶離出來，即為疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)。
- (2) HIC 沒有親和層析法那麼強的專一性，較似離子交換法，但所根據的作用力，則是非極性基團間的疏水性引力。

b. 介質種類：

- (1) Pharmacia 有 Phenyl-及 Octyl-Sepharose 兩種介質，後者疏水性較強。
- (2) 通常樣本溶在 1 M 硫酸銨的緩衝液中通入膠体管柱；吸附上去的蛋白質，可提高緩衝液的疏水性來溶離，例如可用 ethylene glycol 的梯度溶離。

c. 反相 (reverse phase) 層析法：

- (1) 是 HIC 及離子交換法的綜合體，但屬一種 partition 層析；可使用離子交換（或類似 HIC）的介質。

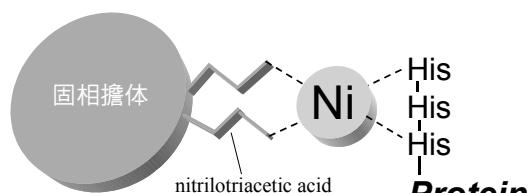
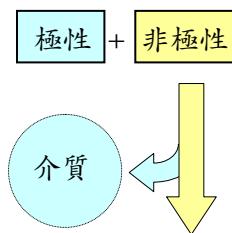


圖 3.10 一種金屬螯合層析法

(2) 混合極性及非極性溶液為流動相，當流動相通入介質後，介質表面可固定其中的極性溶液 (若使用 HIC 則固定非極性者)，樣本分子會在此二相中進行 partition 分離。



(3) 因固定相及流動相的極性剛好相反，故名 reverse phase。請參考圖 3.11。

HIC (liquid-solid)	Reverse Phase Chromatography (liquid-liquid)	
樣本分子吸附到非極性的固定相上，是一種類似離子交換的色析法，但分離因素決定於樣本分子表面的非極性區域。		
 Polar solvent Non-polar area Hydrophobic group Polar area	 Polar solvent Non-polar phase	 Non-polar solvent Polar phase
Using non-polar groups as a stationary phase 動相為極性溶液，固定相為非極性基團或液相，樣本分子則憑其非極性表面與固定相結合，結合力量的強弱與其表面的非極性面積大小有關。		Using ion-exchanger 若非極性的動相中，含有少量極性液體，則後者會附著在離子交換介質表面，形成一極性液態固定相。

圖 3.11 疏水性及反相層析法原理

3.4.5 液相分配 (partitioning) :

a. 作用機制：

- (1) 在分析化學的純化方法中，使用分液漏斗在兩個液相間進行 partitioning 者，多為有機小分子；因所用液相多為有機溶劑，蛋白質不易溶於其中。
- (2) 若在水溶液中加入不同的親水性聚合物，造成密度的差異，則兩個水溶液可成為兩相。依蛋白質對此兩相之親和度不同，可在此二相間進行分配 (partitioning) 而達分離效果。
- (3) 可用的親水性聚合物有 polyethylene glycol (PEG), dextran, Ficoll 等。

b. 親和性分配法：

若在上述的聚合物分子上接有親和性基團，以吸引專一性的目標蛋白質，則稱為 親和性分配 (affinity partitioning)。

3.5 HPLC 及 FPLC :

HPLC 為高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography) 之意；也有說是 high pressure，因為要使用高壓推動溶離液，以加速層析過程。FPLC 則不用高壓，但流洗速度也很快 (fast performance)，是因為所用的介質通透性極高之故。

a. 解析力增加：

通常可降低介質的 粒子大小 以增加層析法的解析力，但是粒子太小會造成流率不佳，反而使解析度下降。 HPLC 是使用 silica 或樹脂等耐壓介質，以極細的粒子 (大約 10 mm)，在高壓下緊密裝填而成。 使用時要在高壓下進行，因此速度比較快，通常在一小時左右可完成。

b. 使用方式廣泛：

較早 HPLC 都用於 adsorption 型式的層析法，例如以離子交換分離各種胺基酸等小分子。 近來由於介質材料的發展，各種應用在大分子的液相層析法，均可 HPLC 的方式來進行；不但加快分析速度，也使解析度提高很多。 除了上述的離子交換法外，還可用在膠體過濾法、逆相層析法或親和層析法； HPLC 及 FPLC 系統，將來有可能取代傳統的低壓慢速液相層析法。

c. FPLC 系統：

為 Pharmacia 所發展的系統，可以不用很高的壓力，在一小時內完成分離； 而其容量更大於 HPLC，可用在製備式純化上 (樣本量可達 500 mg)。

d. Fractogel TSK：

為 Merck 所發展的介質，是一種介於傳統層析法與 HPLC 之間的層析介質，其材質為半固体的 合成聚乙烯 球体 (或其衍生物)，因構造堅固，故流率非常好，操作時間可縮短為三分之一或更短。與傳統介質一樣，可應用在膠體過濾、離子交換及親和層析等方法上，在工業化大規模操作尤其適用。

4 其它純化或分離方法：

要大量純化酵素時，通常前面的步驟還是要使用傳統層析方法，再加上 HPLC 或 FPLC 則可以得到更純的均質蛋白質；製備式電泳及超高速離心法，也可以增加純度，但處理量較少；而超微薄膜過濾法並非純化步驟，但在純化的各階段過程中，可濃縮蛋白質並除去小分子。

4.1 製備式電泳：

製備式電泳通常以不含 SDS 的原態 disc-PAGE 進行，以便回收具有活性的蛋白質；蛋白質樣本要先經過部分純化，否則效果不佳，並先以分析式小電泳確定所要色帶的位置。製備式電泳的詳細操作方法，請見 B3 酵素操作方法 2.4 節。

a. 電泳用具：

商品的製備式電泳器具繁多，都相當複雜昂貴；但使用一般 $8 \times 16\text{ cm}$ 大小的垂直平板電泳，利用 3 mm 厚的間隔條即可進行；量小時用迷你電泳亦足夠使用。

b. 注意事項：

- (1) 鑄膠： 分離膠体只佔全高度一半，焦集膠体佔四分之一，則樣本可佔其餘的四分之一 (以上述大小膠体而言約有 15 mL)；不用樣本齒模，只跑一種樣本。
- (2) 預跑： 最好在樣本加入前，先預跑約 20 min，以除去 APS 的影響。
- (3) 電泳： 可在冷房進行，條件大略同一般電泳，勿使膠体過熱，勿跑太快。
- (4) 定位蛋白質： 方法很多，量多時可以 300 nm 波長紫外光照射，切出所呈現的色帶；否則要先切一小條膠体染色，再比對位置切出色帶。
- (5) 電泳溶離： 收集膠体內的蛋白質，這一步會損失不少蛋白質，要特別小心。

4.2 超高速離心法：

a. 沉降係數：

蛋白質分子在離心時，其 分子量、分子密度、組成、形狀 等，均會影響其沉降速率，沉降係數 即用來描述此沉降性質；其單位為 S (Svedberg unit)，每一種蛋白質的沉降係數與其分子密度或分子量成正比。不同沉降係數的蛋白質，可利用超高速離心法，在密度梯度中作分離。

b. 密度梯度作法：

一般有三種製作梯度的方式：

- (1) 在樣本溶液中直接溶入 CsCl，經離心後自動形成梯度。

- (2) 使用梯度製造器，在離心管內預先拉好甘油或蔗糖的梯度，加樣本後離心。
- (3) 在一極為熟悉的離心操作中，以上亦可以 階段式 (stepwise) 梯度進行。

c. 兩種離心方式：

上述 (1) 及 (2) 二者，分屬兩類不同的離心形式，列表並以圖解說明如下：

表 4.1 兩種超高速離心方式的比較：

離心方法	Sedimentation Velocity	Sedimentation Equilibrium
同義字	Zone Centrifugation	Isopycnic Equilibration
梯度形成方式	預鑄梯度 (蔗糖、甘油) 梯度較淺，密度較低	離心時自動形成 (CsCl) 梯度陡峭，密度較高
適用樣本性質	密度相近、分子量不同者	分子量相近或密度 (S) 不同者
樣本例	蛋白質	核酸、細胞器官
離心情形	速度較低，不完全沉降，要在適當時間停止離心	完全沉降至與樣本密度相同的梯度位置，需高速、長時間

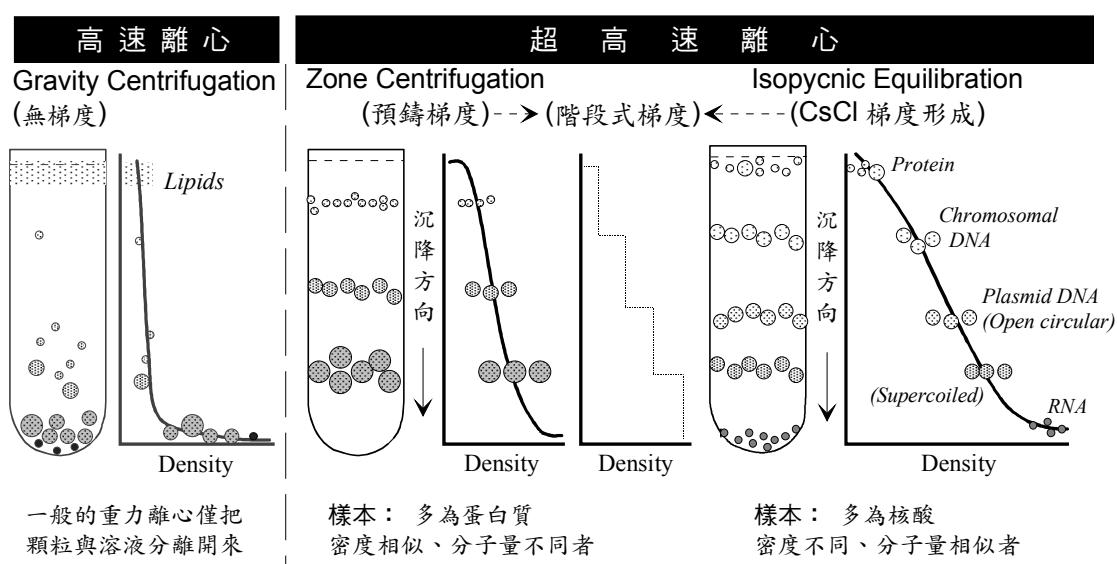


圖 4.1 高速離心與兩種超高速離心法的比較

d. 離心陀種類：

使用不同離心陀，有不同離心方式及效果。

- (1) 角型 (angle rotor)：典型的離心方式，多用在大量製備時。
- (2) 懸籃式 (swing bucket rotor)：傳統用在密度梯度離心。
- (3) 垂直 (vertical rotor)：取代懸籃式，可大大縮短離心時間。
- (4) 區帶 (zonal rotor)：在梯度離心後，可直接分割出各區帶樣本。
- (5) 連續式 (continuous rotor)：可一邊離心，一邊加入或取出樣本。

e. 操作注意：

超高速離心因為轉速極高，離心陀構造也較複雜，操作上要非常小心，完全純熟後才進行實驗，新手要有熟練者在旁指導。操作時特別注意下列各點：

- (1) 離心管的平衡要準確，封管要確實，否則液体可能被抽乾。
- (2) 使用懸籃式離心陀，在懸掛離心管時，要注意有沒有掛妥。
- (3) 轉速切勿超過所使用離心陀的最高限，老舊者的最高限還要打折。
- (4) 離心後要清理離心陀，可用水沖乾淨後晾乾；尤其使用 CsCl 者，非洗不可。
- (5) 時常檢查離心艙及離心陀，注意有無腐蝕及傷痕，有者立刻請廠商檢修。

4.3 超微薄膜過濾法：

a. 超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF)：

- (1) 使用具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子；薄膜上的小孔，只能讓某分子量以下的分子通過，此分子量稱為該薄膜的 cut-off。
- (2) 其基本原理類似透析，但 UF 薄膜的孔徑則更細，而且可選擇孔徑大小。應用這種薄膜技術的方式很多，主要用在濃縮、脫鹽及無菌過濾。
- (3) 另外在純水的製造上，以薄膜配合逆滲透 (reverse osmosis, RO) 所製成的管柱，可除去水中 90% 以上的離子。

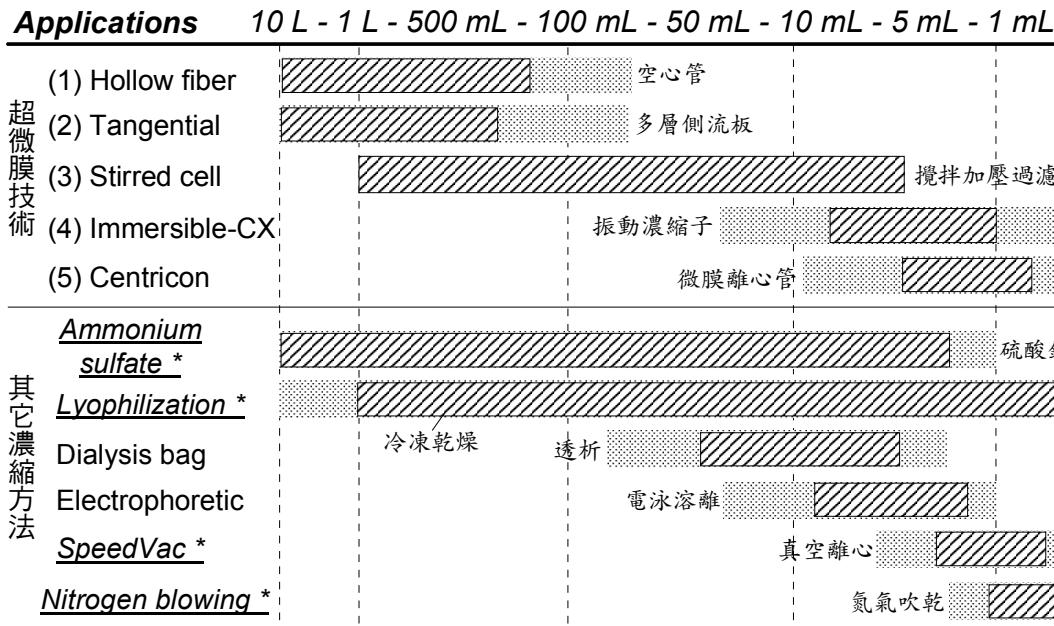
b. 超微膜濃縮裝置：

因樣本體積的大小不同，有各種不同的微膜設計，常用者如下：

- (1) 空心管 (hollow fiber)：微膜薄層鋪在堅固空心小管的內側，當樣本通過空心管時，小分子則由側面擠出，比較不會有局部過濃的問題。
- (2) 多層側流板 (tangential-flow)：多層微膜疊在一起，溶液流動方向與微膜平面成平行，小分子由側向微膜擠出，無局部過濃的問題。
- (3) 攪拌加壓過濾 (stirred cell)：加壓迫使分子濾過微膜，並在薄膜表面攪動，以防止局部過濃而阻塞微膜細孔。
- (4) 振動濃縮子：可直接浸入含有樣本的試管中進行濃縮，微膜平敷在濃縮子表面，以振動去除局部過濃現象，沒有無效體積，故樣本損失量較低。
- (5) 微膜離心管：離心管中橫置一微膜，利用離心力把小分子擠過，大分子留在上方；樣本數目多而體積少時，多採用此法。

c. 其它濃縮方法：

除了上述之超微薄膜系統之外，另有其他常用的濃縮方法：硫酸銨沉澱、冷凍乾燥、透析袋濃縮、電泳溶離、真空冷凍離心、氮氣吹乾等。注意其中有些方法，在濃縮後鹽濃度會提高，而使用超微薄膜則無此缺點。圖 4.2 比較各種濃縮方法的使用體積及範圍；實驗室較常用的是 Stirred cell, Centricon (Centriprep) 及 SpeedVac。



* 注意打星號的濃縮方法在濃縮後其含鹽濃度亦會增加。

圖 4.2 各種濃縮方法的使用範圍比較

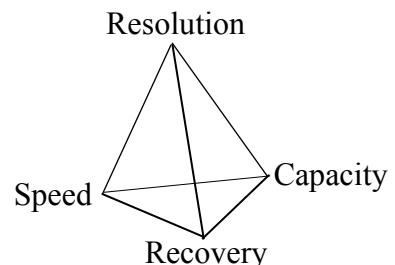
5 純化策略：

正確的純化策略極為重要，往往可以使純化達事半功倍之效，因此事前要有極為充分的準備與規劃過程。但有時對目標酵素所知甚少，就要一步一步去試，可說是摸著石頭過河；此時，要小心追蹤每一個步驟到底回收多少酵素活性？

5.1 純化步驟設計：

5.1.1 影響純化的因素：

設計純化步驟時，需考慮下列各項要求；右圖則是 Pharmacia 操作手冊所建議的四種考慮因素。



a. 高活性：

酵素的比活性要能顯著提高，純化成品與原始粗抽液二者間，其比活性之比值稱為 純化倍率 (purification fold)；各種酵素因材料來源及含量多寡不一，純化倍率也有高低；不過就同一樣本而言，當然越高越好。

b. 高回收率：

一般指總活性的回收，最終回收率低於 30% 就得檢討過程是否有大問題。

c. 高純度：

純度 與 活性 是酵素純化的兩大目的，以達到均質酵素為最終目標；相對而言，在電泳上看不到其它雜質，即可視為均質，但也只能說是 electrophoretically pure；但絕對均質的酵素幾乎是不可能得到，我們只能達到相對純度者。

d. 方便與快速：

方法要儘量簡便，步驟勿拖太久，因為酵素活性可能隨著時間而急速降低；對較不穩定的酵素，時間是最重要因素，有時不得不犧牲其它要求。

e. 經濟：

許多試劑相當昂貴 (尤其是活性分析用藥)，大量使用時要考慮經濟問題。

5.1.2 組合純化步驟：

a. 組合標準：

- (1) 已知的酵素，可依照已發表的步驟進行，有問題再作改進。通常都是以 硫酸銨分離-膠體過濾-離子交換 為骨幹，再加上其它方法，組成全部流程。
- (2) 對完全未知的酵素，可循此骨幹先試行純化，看其結果如何再加改進。
- (3) 不要忘記利用該酵素的特殊性質來純化，如在其 pI 沉澱性、特別的疏水性、有專一的抑制劑或熱穩定性等。

b. 純化方法分類：

- (1) 每種純化方法都是利用蛋白質分子的某種特性來分離的，圖 5.1 把所有的純化方法，依其運用特性分類歸納，以作為設計流程時的參考。
- (2) 通常同一個純化方法不會重複使用，最好是交叉使用各種蛋白質的不同性質，來設計一連串的純化步驟。

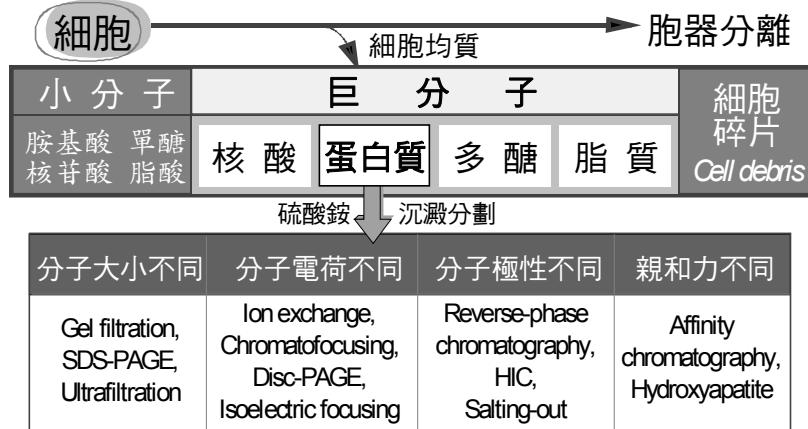


圖 5.1 各種純化及分析方法及所根據的蛋白質性質

5.2 純化結果：

a. 純化表：

純化結果以 純化表 (purification table) 摘要列出整個過程及結果，例如：

表 5.1 蔗糖合成酵素之純化表： 抽取 100 g 水稻乳熟期穀粒。

純化步驟	全蛋白質 (mg)	全部活性 (U)	比活性 (U/mg)	純化倍數 (fold)	回收率
粗抽取液	1,070	9,672	9.0	1.0	100%
魚精蛋白沉澱後上清	800	12,555	15.7	1.7	130%
硫酸銨分劃 (35~55%)	250	6,610	26.4	2.9	68%
Sepharose CL-6B 膠體過濾	53	5,789	111.3	12.4	60%
DEAE Sepharose 離子交換	8.6	2,960	344.2	38.2	31%

b. 檢討純化表：

回收率超過 100% 時，表示粗抽取液中可能含有酵素之抑制因子，或含有干擾活性分析的物質，經去除後酵素活性大增。若回收顯著偏低，表示此一純化步驟並不理想，應探討緩衝液、溶離液成分有無問題，或者是純化流程設計是否不良。

c. 純度的要求：

如上表所純化得到的酵素，以電泳檢定已達相當純度，應可供大多數實驗需要；若有必要，可再經製備式電泳或其它方法純化。請注意並非所有的實驗都必要使用均質酵素，有很多實驗 (如酵素動力學、分子量測定) 都不需完全均質的蛋白質。